

Оригинальные работы

УДК 582:581.165.1:547.459.5

А.Ф. ПОПОВА, Г.Ф. ИВАНЕНКО,
А.Ю. УСТИНОВА, В.А. ЗАСЛАВСКИЙ
Институт ботаники им. Н.Г. Холодного НАН Украины, Киев
E-mail: afropova@ukr.net

ЛОКАЛИЗАЦИЯ КАЛЛОЗЫ В МИКРОСПОРАХ И ПЫЛЬЦЕВЫХ ЗЕРНАХ РАСТЕНИЙ *SIUM LATIFOLIUM* L. В УСЛОВИЯХ РАЗНОГО ВОДНОГО РЕЖИМА



*Представлены результаты исследований топографии и содержания каллозы в процессе микроспорогенеза, а также формирования пыльцевых зерен у сухолюбивых и воздушно-водных растений *Sium latifolium* L., произрастающих в условиях различного водного режима. На основании интенсивности флуоресценции каллозы и количественного люминесцентного анализа выявлено повышенное содержание каллозы в оболочках микроспор на стадии тетрад и пыльцевых зерен сухолюбивых растений *S. latifolium*, что связано, очевидно, в первую очередь, с защитной ролью каллозы для сбережения влаги в условиях водного дефицита.*

© А.Ф. ПОПОВА, Г.Ф. ИВАНЕНКО, А.Ю. УСТИНОВА,
В.А. ЗАСЛАВСКИЙ, 2008

Введение. Водный стресс как следствие дефицита воды в почве или затопления растений вызывает довольно широкий спектр метаболических нарушений [1], которые нередко приводят к аномалиям в процессе микро- и макроспорогенеза, развития мужского и женского гаметофитов, а также формирования семян и плодов [2, 3]. Существует четкая корреляция количества и качества семян с водным режимом [4].

Хотя растения на разных стадиях репродуктивного развития реагируют на водный дефицит, однако именно этап микроспорогенеза считается очень чувствительным к упомянутому фактору, что в дальнейшем может приводить к снижению жизнеспособности пыльцевых зерен, вплоть до их полной стерильности [5].

Процесс микроспорогенеза, в результате чего формируется тетрада гаплоидных микроспор, начинается с мейотического деления материнских клеток микроспор (МКМ). Последние образуются путем последовательных митотических делений археспориальных клеток, расположенных в полости каждого микроспорангия пыльника.

В начале профазы мейоза на стадии лептотены на оболочках МКМ начинает откладываться каллоза – нерастворимый полисахарид β -1,3-глюкан, который состоит из остатков глюкозы, соединенных в спиральную цепочку [6, 7]. В течение микроспорогенеза процесс синтеза каллозы постепенно прогрессирует и достигает максимума на стадии формирования тетрад микроспор, вследствие чего оболочка каждой микроспоры содержит толстый каллозный слой [8]. В результате активации фермента каллазы (β -1,3-глюканазы) в дальнейшем происходит растворение каллозной оболочки и освобождение сформированных микроспор из тетрад. С увеличением размера микроспор и делений их ядер они становятся пыльцевыми зернами, т.е. мужским гаметофитом.

Одним из механизмов возникновения существенных отклонений в процессе микроспорогенеза и формирования мужского гаметофита в условиях водного дефицита являются нарушения синтеза каллозы [9]. Считают [10], что это может быть следствием изменения активности ферментов, в первую очередь участвующих в метаболизме углеводов, в том числе и углеводов клеточной оболочки [11]. Нарушение темпов синтеза или гидролиза каллозы,

наблюдаемое у растений с цитоплазматической мужской стерильностью, подтверждает ее необходимость для развития нормальных пыльцевых зерен [12]. Тот факт, что нарушения синтеза каллозы наблюдаются под влиянием разных экологических факторов, в частности водного дефицита [13], низкой или высокой температуры [14], указывает на универсальную роль упомянутого полисахарида для нормального протекания процесса микроспорогенеза и формирования мужского гаметофита.

Целью нашей работы были сравнительные исследования локализации и содержания каллозы в процессе формирования микроспор и мужского гаметофита у растений *Sium latifolium* L. в условиях разного водного режима.

Материалы и методы. Объектом исследования были растения *S. latifolium*, которые росли в прибрежной воде и по берегам речки Псел (Полтавская обл.) (воздушно-водный и суходольный экотипы).

Учитывая, что соцветие *S. latifolium* представляет собой сложный зонтик, состоящий из 15–17 мелких зонтиков, несколько различающихся по степени развития, для сравнительных исследований содержания и локализации каллозы в оболочках микроспор и пыльцевых зерен фиксировали пыльники из бутонов и цветков только внешнего ряда крайних зонтиков соцветия. Это давало возможность подобрать материал идентичного возраста у растений обоих экотипов. Фиксацию пыльников осуществляли фиксатором Карнуа, после обезвоживания материал заключали в парафин. Срезы пыльников толщиной 10 мкм изготавливали с помощью санного микротомы Reichert (Германия).

Для светооптических исследований препараты окрашивали основным фуксином и светлым зеленым по Модилевскому, а также реактивом Шиффа по Фельгену [15]. Срезы заключали в пермаунт (Permount, Fisher Chemical).

Для изучения локализации каллозы в клетках микроспороцитов, микроспор и пыльцевых зерен срезы обрабатывали 0,05%-ным раствором анилинового синего на 0,06 М фосфатном буфере с pH 8,4 и заключали в 65%-ную сахарозу [16]. Срезы изучали в конфокальном микроскопе LSM-5, Pascal («Карл Цейс», Германия). Для выявления каллозы ис-

пользовали лазер с длиной волны возбуждения 405 нм и длиной волны выхода 530 нм, с фильтрами LP530 и BP420–490 (pinhole 1,60).

Для выявления количественного содержания каллозы срезы, обработанные раствором анилинового синего, изучали с помощью люминесцентного микроскопа ML («Карл Цейс», Германия), регистрируя величину квантового выхода люминесценции, которая отвечает концентрации каллозы. Для этого на случайно выбранных трех участках каллозной оболочки микроспор, находящихся в тетрадах, измеряли концентрацию каллозы. Для измерений использовали по 50 микроспор суходольного и воздушно-водного экотипов. Статистическую обработку полученных данных осуществляли общепринятыми методами вариационной статистики с помощью программного обеспечения STATISTICA 5.0 (Stat soft Inc., Tulza, OK, USA, 1995). Статистически достоверными считали отличия между средними значениями сравниваемых показателей при $P < 0,5$.

Результаты исследований и их обсуждение.

Как показал проведенный анализ, пыльники воздушно-водных и суходольных растений *S. latifolium* существенно не различаются по размеру ($1,3 \pm 0,7$ и $1,5 \pm 0,6$ мм соответственно), хотя имеют разную окраску – светло-сиреневого оттенка у воздушно-водных растений и белого цвета у суходольных.

На момент формирования МКМ стенка микроспорангиев *S. latifolium* состоит из эпидермиса, эндотеция и тапетума. Клетки последнего имеют крупные ядра с 3–5 ядрышками. Размеры МКМ у растений обоих экотипов существенно не различаются. В частности, у суходольных растений диаметр МКМ составляет $20,54 \pm 1,9$ мкм, у воздушно-водных – $19,78 \pm 1,7$ мкм. Тетрады у *S. latifolium* формируются по симультанному типу, т.е. цитокинез происходит лишь после второго мейотического деления МКМ. Освободившиеся из тетрад микроспоры имеют несколько угловатую форму и по мере увеличения их размера становятся продолговатыми. Как правило, нарушения в процессе формирования микроспор у воздушно-водных и суходольных растений *S. latifolium* почти не наблюдаются.

Зрелые пыльцевые зерна у растений *S. latifolium* овально-вытянутой формы, трехборзд-

чатые с тремя апертурами, трехклеточные, т.е. имеют вегетативную клетку и два спермия. Размеры зрелых пыльцевых зерен по продольному их диаметру у суходольных и воздушно-водных растений достоверно не различаются: у воздушно-водных растений — $20,81 \pm 1,5$ мкм, у суходольных — $21,24 \pm 1,7$ мкм. Статистически достоверные различия выявляются лишь по размеру тетрад микроспор между исследуемыми растениями *S. latifolium* (рис. 1, см. вклейку), в частности размер тетрад ($22,95 \pm 1,6$ мкм) у суходольных растений превышает аналогичный показатель ($19,38 \pm 1,2$) у воздушно-водных.

Не отмечено существенных различий в процессе микроспорогенеза и формирования зрелых пыльцевых зерен у растений *S. latifolium* обоих экотипов в условиях разного водного режима, как это мы отмечали и у растений *Alisma* в этих условиях [17]. Лишь в отдельных случаях наблюдались стерильные пыльцевые зерна в одном или двух гнездах пыльника.

Однако в материале, фиксированном на протяжении засушливого летнего периода 2004 г., отмечены частые случаи появления большого количества дегенерирующих пыльцевых зерен у суходольных растений, что совпадает с данными некоторых авторов [10] о возрастании процента формирования стерильных пыльцевых зерен в условиях водного стресса.

Анализ локализации каллозы на основе ее флуоресценции на разных стадиях микроспорогенеза показал, что переход МКМ к мейозу связан с началом синтеза каллозы. Отложения каллозы на оболочках МКМ в процессе их подготовки к мейозу наблюдаются в виде сплошного слоя у суходольных растений; у воздушно-водных растений включения каллозы незначительные, причем они располагаются неравномерно.

В процессе образования тетрад микроспор отмечается максимальная аккумуляция каллозы на оболочках микроспор как у суходольных, так и воздушно-водных растений. При светоптическом исследовании каллозный слой в оболочках микроспор, находящихся в тетрадах, выявляется в виде светлого кольца вокруг каждой микроспоры (рис. 2, а, б, см. вклейку).

При флуоресцентном изучении в конфокальном микроскопе каллоза наблюдается в ви-

де довольно толстого слоя зеленоватой окраски в оболочках микроспор тетрады, благодаря чему каллозные оболочки тесно контактируют между собою внутри тетрады, и создается впечатление, что микроспоры погружены в каллозу (рис. 3, а, б, см. вклейку).

Визуально не выявлены различия по степени аккумуляции каллозы на оболочках микроспор, находящихся в тетрадах, между воздушно-водными и суходольными растениями *S. latifolium*.

Однако уровень интенсивности флуоресценции каллозы в оболочках микроспор у суходольных растений более высокий по сравнению с аналогичным показателем у воздушно-водных растений (рис. 4, а, б, см. вклейку), что свидетельствует о более высоком ее содержании.

По наличию каллозы в оболочках микроспор непосредственно после их освобождения из тетрад, когда они еще имеют угловато-округлую форму, не выявлено различий между исследуемыми растениями *S. latifolium*.

Только в оболочках сформированных микроспор отмечаются четкие различия по аккумуляции каллозы между суходольными и воздушно-водными растениями *S. latifolium*, в частности, отложения каллозы у суходольных растений несколько интенсивнее по сравнению с воздушно-водными, что подтверждается и уровнем интенсивности ее флуоресценции.

Именно каллоза на оболочках микроспор, когда они находятся в тетрадах, играет важную роль в их дальнейшем развитии [8], осуществляя изоляцию микроспор и предупреждая слипание их оболочек [18], что является необходимой предпосылкой для развития нормальных пыльцевых зерен.

В пользу высказанных предположений свидетельствуют данные о том, что отсутствие синтеза каллозы на этой стадии приводит в дальнейшем к формированию неполноценных пыльцевых зерен, как это показано у растений *Pergularia daemia* [19]. Наличие в полости пыльников капель каллозы вместо ее типичной локализации в оболочках микроспор в условиях продолжительного водного дефицита рассматривают [20] как доказательство нарушений процессов ее гидролиза и утилизации в этих условиях, причем выявляется

четкая взаимосвязь между преждевременным гидролизом каллозы и формированием стерильного мужского гаметофита. Иммуно-цитохимическим методом подтверждено наличие коррелятивной связи между значительным снижением синтеза каллозы и нарушениями процессов цитокинеза во время формирования оболочек микроспор [14]. Авторы считают, что именно преждевременный катаболизм каллозы ограничивает образование в будущем нормальной оболочки пыльцевого зерна, как было показано при воздействии на пыльники низкой температуры [14].

Зрелые пыльцевые зерна, как и сформированные микроспоры, у суходольных и воздушно-водных растений *S. latifolium* существенно различаются по содержанию каллозы (рис. 5, а, б, см. вклейку).

В то время как в оболочках пыльцевых зерен суходольных растений наблюдаются отложения каллозы, о чем свидетельствует их окраска и уровень флюоресценции каллозы, оболочки пыльцевых зерен воздушно-водных растений имеют очень незначительные включения каллозы, что подтверждается их окраской (рис. 4, б).

Результаты исследований количественного содержания каллозы показали, что концентрация каллозы в оболочках микроспор достоверно выше в тетрадах у суходольных растений *S. latifolium* по сравнению с воздушно-водными. В частности, у суходольных растений величина квантового выхода каллозы в оболочках микроспор на стадии тетрад составляла $75,3 \pm 2,4$ мкА, тогда как у воздушно-водных — $61,4 \pm 2,6$ мкА.

Наличие повышенного содержания каллозы в оболочках микроспор и пыльцевых зерен суходольных растений, вероятно, связано с защитной ролью каллозы от потери влаги этими клетками, что способствует сохранению их жизнеспособности в условиях недостаточного водообеспечения. Считают, что каллоза действует как молекулярной фильтр, значительно ограничивая выход и поступление различных веществ в эти клетки и сохраняя влагу, вероятно, благодаря ее мелкофибриллярной структуре и высокой гигроскопичности, а также отсутствию плазмодесм в оболочке пыльцевых зерен [3]. Об адаптивной роли каллозы свиде-

тельствуют данные о наименьшей чувствительности микроспор к недостатку воды в условиях засухи, когда они находятся на стадии тетрад и окружены каллозной оболочкой [6]. Микроспоры, в которых синтез каллозы уже завершился, испытывали под действием засухи значительное обезвоживание, в результате чего они сильно сморщивались.

Одним из механизмов нарушений в процессе формирования микроспор и пыльцевых зерен, что нередко приводит к мужской цитоплазматической стерильности, могут быть изменения ритма энзиматической активности каллазы [21], функциональная активность которой выявляется в клетках тапетума [22]. В пользу данных о зависимости формирования нормальных пыльцевых зерен от темпов катаболизма каллозы свидетельствуют эксперименты с мутантными растениями [12], у которых гиперэкспрессия каллазы приводила к развитию нежизнеспособной пыльцы с деформированной экзиной. Нарушения синтеза и гидролиза каллозы в генеративных клетках в условиях водного дефицита могут быть результатом отклонений в углеводном обмене, что отмечено рядом авторов на основе генной экспрессии у стерильных и фертильных линий риса в процессе формирования пыльцевых зерен [23].

Таким образом, процесс микроспорогенеза и формирования мужского гаметофита у растений *S. latifolium* характеризуется разным содержанием каллозы в оболочках микроспор и пыльцевых зерен, что, вероятно, объясняется влиянием условий различного водного режима.

Выводы. Выявлено, что отложения каллозы в оболочках микроспор и зрелых пыльцевых зерен более интенсивные у суходольных растений *S. latifolium* по сравнению с воздушно-водными, что подтверждается уровнем интенсивности ее флюоресценции и данными количественного люминесцентного анализа.

Одним из механизмов регуляции отложений каллозы в процессе формирования микроспор и пыльцевых зерен у суходольных растений *S. latifolium*, возможно, являются изменения активности фермента каллазы, а именно, ее снижение, что может приводить к неполному гидролизу каллозы в ответ на действие водного дефицита.

A.F. Popova, G.F. Ivanenko,
A.Yu. Ustinova, V.A. Zaslavsky

LOCALIZATION OF CALLOSE IN
MICROSPORES AND POLLEN GRAINS OF *SIUM*
LATIFOLIUM PLANTS UNDER DIFFERENT
WATER REGIMES

Results of study of callose content and its topography in mother cells of microspores, microspores and pollen grains in terrestrial and air-aquatic *S. latifolium* plants growing under different water regimes are presented. The increased content of callose in the microspore walls at tetrad stage and pollen grains is revealed on the basis of fluorescence intensity and quantitative luminescent analysis of terrestrial *S. latifolium* plants. It is connected, probably, first of all, with the protective role of callose for preservation of water in these cells under water deficiency.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Griffiths H., Parry M.A.J. Plant responses to water stress // Ann. Bot. — 2002. — **89**, № 1. — P. 801–802.
2. Спицын И.П., Андросова Е.П. Влияние водного дефицита на возникновение аномалий репродуктивных органов у вишен. Биология и экология растений. — Тамбов : Изд-во Тамб. гос. ун-та, 1996. — С. 52–53.
3. Sun K., Hunt K., Hauser B.A. Ovule abortion in *Arabidopsis* triggered by stress // Plant Physiol. — 2004. — **135**, № 4. — P. 2358–2367.
4. Boyer J.S., Westgate M.E. Grain yields with limited water // J. Exp. Bot. — 2004. — **55**, № 407. — P. 2385–2394.
5. Sheoran I.S., Saini H.S. Drought-induced male sterility in rice: changes in carbohydrate levels and enzyme activities associated with the inhibition of starch accumulation in pollen // Sex Plant Reprod. — 1996. — **9**, № 1. — P. 161–169.
6. Барская Е.И., Баллина Н.В. О роли каллозы в пыльниках растений // Физиология растений. — 1971. — **18**, № 4. — С. 716–721.
7. Nishikawa S. I., Zinkl G.M., Swanson R.G. et al. Callose (β -1,3 glucan) is essential for *Arabidopsis* pollen wall patterning, but not tube growth // Plant Biol. — 2005. — **22**, № 5. — P. 1345–1352.
8. Pacini E. Cell biology of anther and pollen development // Genetic control of self-incompatibility and reproductive development in flowering plants. — Kluwer : Acad. publ., 1994. — P. 83–96.
9. Dubois T., Guedira M., Dubois J., Wasseur J. Direct somatic embryogenesis in root of *Cichorium*: is callose an early marker? // Ann. Bot. — 1990. — **65**, № 5. — P. 539–545.
10. Koonjul K., Minhas J.S., Nunes C. et al. Selective transcriptional down-regulation of anther invertases precedes the failure of pollen development in water-stressed wheat // J. Exp. Bot. — 2005. — **56**, № 409. — P. 179–190.
11. Zhuang Yu., Ren G., Yue G. et al. Effects of water-deficit stress on the transcriptomes of developing immature ear and tassel in maize // Plant Cell Rep. — 2007. — **1**, № 8. — P. 1–8.
12. Chasan R. Breaching the callose wall // Plant Cell. — 1992. — **4**, № 7. — P. 745–746.
13. Lalonde S., Dwight U., Beebe H., Saini S. Early signs of disruption of wheat anther development associated with the induction of male sterility by meiotic-stage water deficit // Sex. Plant Rep. — 1997. — **10**, № 1. — P. 40–48.
14. Mamun E.A., Alfred S., Cantrill L.C. et al. Effects of chilling on male gametophyte development in rice // Cell Biol. Inter. — 2006. — **30**, № 1. — P. 583–591.
15. Наумов Н.А., Козлов В.Е. Основы ботанической микротехники. — М.: Наука, 1954. — С. 254–276.
16. Шалумович В.П. Среда для заключения флуорохромированных гистологических срезов // Арх. анатомии, гистологии и эмбриологии. — 1959. — **366**, № 2. — С. 79.
17. Попова А.Ф., Кордюм С.Л., Мартин А.Г. Формування генеративної сфери у форм *Alisma plantago-aquatica* в умовах різного водозабезпечення // Укр. бот. журн. — 1999. — **56**, № 1. — С. 24–30.
18. Laser K.D., Lersten N.R. Anatomy and cytology of microsporogenesis in cytoplasmic male sterile angiosperms // Bot. Rev. — 1972. — **38**, № 3. — P. 425–454.
19. Vijayaraghvan M.R., Shukla A.K. Absence of callose around the microspore tetrad and poorly developed exine in *Pergularia daemia* // Ann. Bot. — 1977. — **41**, № 4. — P. 923–926.
20. Worrall D., Hird D.L., Hodge R. et al. Premature dissolution of the microsporocyte callose wall causes male sterility in transgenic tobacco // Plant Cell. — 1992. — **4**, № 1. — P. 759–771.
21. Izhar S., Frankel R. Mechanism of male sterility in *Petunia*. The relationship between pH, callase activity in the anthers and the breakdown of the microsporogenesis // Theor. Appl. Genet. — 1971. — **41**, № 3. — P. 104–108.
22. Tsuchiya T., Toriyama T., Yoshikawa M. et al. Tapetum-specific expression of the gene for an endo- β -1,3-glucanase causes male sterility in transgenic tobacco // Plant Cell Physiol. — 1995. — **36**, № 3. — P. 487–494.
23. Kong J., Li Z., Tan Y.-P. et al. Different gene expression patterns of sucrose-starch metabolism during pollen maturation in cytoplasmic male-sterile and male-fertile lines of rice // Physiol. Plant. — 2007. — **130**, № 1. — P. 136–147.

Поступила 05.12.07